

POLYESTER COPOLYMER AND ITS PRODUCTION

Publication number: JP1048821

Publication date: 1989-02-23

Inventor: DOI YOSHIHARU

Applicant: MITSUBISHI CHEM IND

Classification:

- international: C08G63/06; A01N25/10; A61L17/00; C08G63/00; C08G63/40; C12N1/20; C12P7/62; C12R1/05; A01N25/10; A61L17/00; C08G63/00; C12N1/20; C12P7/62; A61L17/00; (IPC1-7): A01N25/10; C08G63/06; C08G63/40; C12N1/20; C12P7/62; C12R1/05

- European:

Application number: JP19870204538 19870818

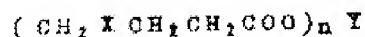
Priority number(s): JP19870204538 19870818

[Report a data error here](#)

Abstract of JP1048821

PURPOSE: To obtain the title copolymer of excellent impact resistance, by multiplying microorganisms having an ability of producing poly-3-hydroxybutyrate in the former stage and multiplying them in the presence of a specified compound under culture conditions of limited N or P in the latter stage.

CONSTITUTION: Microorganisms having an ability of producing poly-3-hydroxybutyrate (e.g., *Alcaligenes eutrophus*) are multiplied in the former stage under culture conditions of a pH of 6-10 and 20-40 deg.C and multiplied in the presence of a compound of the formula (wherein X is OH or a halogen, n is 1-4, and Y is H or mono- to tetra-valent metal atom), e.g., 4-hydroxybutyric acid, to allow the bacteria to form and accumulate poly-3-hydroxybutyrate in their cells. The cells are recovered, and washed and dried, and a poor solvent is added to the cells to obtain the title copolymer comprising 97-40mol.% 3-hydroxybutyrate units and 3-60mol.% 4-hydroxybutyrate units and having an intrinsic viscosity (in chloroform at 30 deg.C) of 0.4-10.0dl/g.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平8-19227

(24) (44) 公告日 平成 8 年(1996) 2 月28日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 G 63/06	N L P			
63/40	N L K			
C 1 2 P 7/62		7432-4B		
// A 6 1 L 17/00				
(C 1 2 P 7/62				

発明の数 2 (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願昭62-204538	(71) 出願人	999999999 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内 2 丁目 5 番 2 号
(22) 出願日	昭和62年(1987) 8 月18日	(72) 発明者	土肥 義治 神奈川県横浜市旭区今宿町2617-39
(65) 公開番号	特開平1-48821	(74) 代理人	弁理士 長谷川 曉司
(43) 公開日	平成 1 年(1989) 2 月23日		
		審査官	谷口 博

(54) 【発明の名称】 ポリエステル共重合体およびその製造法

1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 3-ヒドロキシブチレート単位97~40モル%および4-ヒドロキシブチレート単位3~60モル%からなり、30℃クロロホルム中で測定した $[\eta]$ が0.4~10.0dl/gの範囲にあるポリエステル共重合体

【請求項 2】 ポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有する微生物を、前段で菌体を増殖させ、後段で該菌体*

2

*を窒素あるいはリンの制限下で培養して該菌体内にポリ-3-ヒドロキシブチレートを生成、蓄積させるに際して、後段の培養を下記一般式 (I) で表わされる化合物の存在下におこなうことを特徴とする3-ヒドロキシブチレート単位および4-ヒドロキシブチレート単位からなるポリエステル共重合体の製造法。

$(\text{CH}_2\text{XCH}_2\text{CH}_2\text{COO})_n\text{Y}$

(I)

但し、式中 X はヒドロキシル基またはハロゲン原子を、n は 1 ~ 4 の整数を、Y は水素原子または 1 ~ 4 価の金属原子を示す。

【発明の詳細な説明】

〔産業上の利用分野〕

本発明は3-ヒドロキシブチレート単位（以下3HB成分と記す）および4-ヒドロキシブチレート単位（以下4HB成分と記す）を含有する共重合体およびその製造法に関し、さらに詳しくはポリエステルを蓄積できる微生物を用いて製造される3HB成分と4HB成分からなる新規の共重合ポリエステル及びその製造法に関する。

〔従来の技術〕

ポリ-3-ヒドロキシブチレート（PHB）は、エネルギー貯蔵物質として数多くの微生物の菌体内に蓄積され、優れた生物分解性と生体適合性を示す熱可塑性高分子であることから、環境を保全する“クリーン”プラスチックとして注目され、手術糸や骨折固定用材などの医用材料および医薬や農薬を徐々に放出する徐放性システムなどの多方面への応用が長年にわたり期待されてきた。特に近年、合成プラスチックが環境汚染や資源循環の観点から深刻な社会問題となるに至り、PHBは石油に依存しないバイオポリマーとして注目されている。

〔発明が解決しようとする問題点〕

しかしながら、PHBは剛直なポリマーのため、耐衝撃性に欠けるという物性上の問題を持ち、用途展開が困難との理由から工業的生産が見送られてきた。そこでこの耐衝撃性改良を目的にした研究が鋭意なされてきた。

例えば特開昭57-150393号公報および特開昭59-220192号公報には共重合成分として3-ヒドロキシバリレート（以下3HV成分と記す）を含むPHB共重合体が開示されている。これらの公報では、従来のPHBの製造法と同様に、前段では菌体を増殖させ、後段では窒素あるいはリ*

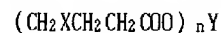
*ンを制限して微生物を増殖し、共重合体を製造するものである。この3HB-3HV共重合体は柔軟性に富み、材料として有望ではある。しかしながら3HV成分が増大すると、これに伴った融点（ T_m ）降下が著しく、例えば3HVが25モル%での T_m は約120℃まで低下してしまう。更に3HV含有量の変化に伴う融点の変化が激しい為、工業的に均一な製品を得ることは極めて困難な状況にあった。

〔問題を解決するための手段〕

本発明者は以上の点に鑑み、PHBに柔軟性を賦与すると同時に比較的高く、かつ安定した融点を示す共重合体を得るべく鋭意検討した結果、後段の窒素あるいはリンを制限する培養に於いて、特定の化合物の存在下でPHB生産能を有する微生物を培養するとこの菌体中に、目的とする共重合体が生成、蓄積することを見出し本発明に到達した。すなわち本発明は、

(1) 3-ヒドロキシブチレート単位97~40モル%および4-ヒドロキシブチレート単位3~60モル%からなり、30℃クロロホルム中で測定した $[\eta]$ が0.4~10.0dl/gの範囲にあるポリエステル共重合体。

(2) ポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有する微生物を、前段で菌体を増殖させ、後段で該菌体を窒素あるいはリンの制限下で培養して該菌体内にポリ-3-ヒドロキシブチレートを生成、蓄積させるに際して、後段の培養を下記一般式(1)で表わされる化合物の存在下におこなうことを特徴とする3-ヒドロキシブチレート単位および4-ヒドロキシブチレート単位からなるポリエステル共重合体の製造法



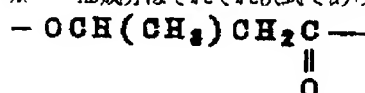
(1)

但し、式中Xはヒドロキシル基または
ヘロゲン原子を、nは1~4の整数を、
Yは水素原子または1~4価の金属原子
を示す。

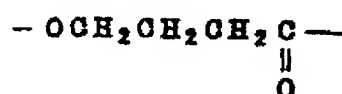
に存在する。

以下、本発明を詳細に説明する。

3HB成分；



4HB成分；



本発明で使用される微生物は、PHB生産能を有する微生物であれば特に制限はないが、実用上は、たとえば、アルカリゲネス フェカリス (Alcaligenes faecalis)、アルカリゲネス ルーランディイ (Alcaligenes ruhlandii)、アルカリゲネス ラタス (Alcaligenes la★50

※ 本発明において共重合体に含有される3HB成分および4

※ HB成分はそれぞれ次式であらわされる。

★tus)、アルカリゲネス アクアマリヌス (Alcaligenes aquamarinus) およびアルカリゲネス ユウトロフス (Alcaligenes eutrophs) 等のアルカリゲネス属などがある。

これらの菌種に属する菌株の代表例として、アルカリ

ゲネス フェカリスATCC8750、アルカリゲネス ルーランディ ATCC15749、アルカリゲネス ラタスATCC29712、アルカリゲネス アクアマリヌスATCC14400ならびにアルカリゲネス ユウトロフスH-16ATCC17699およびこのH-16株の突然変異株であるアルカリゲネス ユウトロフスNCIB11597、同NCIB11598、同NCIB11599、同NCIB11600などを挙げることができる。これらのうち、実用上、アルカリゲネス ユウトロフスH-16ATCC17699およびアルカリゲネス ユウトロフスNCIB11599が特に好ましい。

アルカリゲネス属に属するこれらの微生物の菌学的性質は、たとえば、“BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY: Eighth Edition, The Williams & Wilkins Company/Baltimore”に、また、アルカリゲネス ユウトロフスH-16の菌学的性質は、たとえば、J. Gen. Microbiol., 115, 185~192 (1979) にそれぞれ記載されている。

これらの微生物は、従来の方法と同様に、主として菌体を増殖させる前段の培養と、窒素もしくはりんを制限して菌体内に共重合体を生成、蓄積させる後段の培養との2段で培養される。

前段の培養は、微生物を増殖させる為の通常の培養法を適用することができる。すなわち、使用する微生物が増殖し得る培地および培養条件を採用すればよい。

培地成分は、使用する微生物が資化し得る物質であれば特に制限はないが、実用上は、炭素源としては、たとえば、メタノール、エタノールおよび酢酸などの合成炭素源、二酸化炭素などの無機炭素源、酵母エキス、糖蜜、ペプトンおよび肉エキスなどの天然物、アラビノース、グルコース、マンノース、フラクトースおよびガラクトースなどの糖類ならびにソルビトール、マンニトールおよびイノシトールなど、窒素源としては、たとえば、アンモニア、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒*

* 素化合物および/または、たとえば、尿素、コーン・スチープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物ならびに無機成分としては、たとえば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、りん酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩、ニッケル塩、クロム塩、ほう素化合物およびよう素化合物などからそれぞれ選択される。

また、必要に応じて、ビタミン類なども使用することができる。

培養条件としては、温度は、たとえば、20~40℃程度、好ましくは25~35℃程度とされ、また、pHは、たとえば、6~10程度、好ましくは6.5~9.5程度とされる。このような条件で好氣的に培養する。

これらの条件をはずして培養した場合には、微生物の増殖は比較的悪くなるが、これらの条件をはずして培養することを妨げない。

培養方式は、回分培養または連続培養のいずれでもよい。

前段の培養によって得られた菌体を、さらに窒素および/またはりん制限条件下で培養する。

すなわち、前段の培養で得られた培養液から微生物の菌体を、濾過および遠心分離のような通常の固液分離手段により分離回収し、この菌体を後段の培養に付するか、または、前段の培養において、窒素および/またはりんを実質的に枯渇させて、菌体を分離回収することなく、この培養液を後段の培養に移行させることによってできる。

この後段の培養においては、培地または培養液に窒素および/またはりんを実質的に含有せず、かつ、下記一般式(I)で表わされる化合物を炭素源として含有させる以外には、前段の培養と異なるところはない。



但し、式中Xはヒドロキシル基またはハロゲン原子を、nは1~4の整数を、Yは水素原子あるいは1~4価の金属原子を示す。

一般式(I)で表わされる化合物としては具体的には、4-ヒドロキシ酪酸、4-クロロ酪酸、4-ブロモ酪酸等の酪酸誘導体およびそれぞれのナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、アルミニウム塩等を挙げることができる。

かかる一般式(I)で表わされる化合物は、後段の培養における培地もしくは培養液に含有せしめられる。後者の場合には、培養の初期乃至終期のどの時点でも良いが培養の初期が好ましい。

* 一般式(I)で表わされる化合物の使用量は、共重合体を生成させることができ、かつ、微生物の生育を阻害しないような量であればよく、使用した微生物の菌株および共重合体中の4HB成分の所望の割合などによって異なるが、一般に培地もしくは培養液の一般式(I)で表わされる化合物の比率を高くすると、共重合体中の4HB成分の割合が多くなる。通常は、培地もしくは培養液1g当たり、一般式(I)で表わされる化合物として3~40g程度、好ましくは5~30g程度である。

この後段の培養においては、一般式(Ⅰ)で表わされる化合物を唯一の炭素源としてもよいが、使用した微生物が資化し得る他の炭素源—たとえば、グルコース、フラクトース、メタノール、エタノール、酢酸、プロピオン酸、 n -酪酸、および乳酸などを少量共存させることもできる。たとえば、グルコースを使用する場合には、多くても1.5g/ℓ程度とされる。

このように培養して得られた培養液から、濾過および遠心分離などの通常の固液分離手段によって菌体を分離回収し、この菌体を洗浄、乾燥して乾燥菌体を得、この乾燥菌体から、常法により、たとえば、クロロホルムのような有機溶剤で生成された共重合体を抽出し、この抽出液に、たとえば、ヘキサンのような貧溶媒を加えて、共重合体を沈澱させる。

本発明の製造法によって、適切な反応条件をとれば共重合体中の3HB成分に対する4HB成分の割合は任意に調節することができる。そして本発明によって得られる共重合体は、比較的高く、かつ安定した融点を保持しつつ、結晶化度が小さい為柔軟性に富んでいる。そこで紡糸および圧延等の成形性が良く、また得られた繊維やフィルム等の成形品は、しなやかで、かつ強靱である。

〔実施例〕

本発明を、実施例によりさらに具体的に説明する。なお、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

実施例1～9及び比較例1

アルカリゲネス ユウトロフスH-16ATCC17699を使用して共重合体を製造した。すなわち、

前段培養：

つぎの組成を有する培地で前記の微生物を30℃で24時間培養し、対数増殖期終期の培養液から遠心分離により菌体を分離した。

前段培養用培地の組成

酵母エキス10g ポリペプトン 10g
肉エキス 5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g

これらを脱イオン水1ℓに溶解し、pH7.0に調整した。

後段培養：

前段培養で得られた菌体を、つぎの組成を有する培地*

表

*に、1ℓあたり5gの割合で懸濁させ30℃で48時間培養し、得られた培養液から遠心分離により菌体を分離して、菌体を得た。

後段培養用培地の組成

0.5M	りん酸水素カリウム水溶液	39.0ml
0.5M	りん酸水素二カリウム水溶液	53.6ml
20wt/V%	硫酸マグネシウム水溶液	1.0ml
	炭素源*	
	ミネラル溶液**	1.0ml

10 *炭素源として後記表1の割合で、4-ヒドロキシ酪酸および酪酸を使用した。

(単位 g/ℓ培地)

**ミネラル溶液

CoCl_2	119.0mg
FeCl_3	9.7g
CaCl_2	7.8g
NiCl_2	118.0mg
CrCl_2	62.2mg
CaSO_4	156.4mg

20 を0.1N-HCl1ℓに溶解

これらを脱イオン水1ℓに溶解し、pH7.0に調整した。

菌体の処理：

後段培養で得られた菌体を蒸留水で洗浄し、引続きアセトンで洗浄し、これを減圧乾燥(20℃、0.1mmHg)して乾燥菌体を得た。

共重合体の分離回収：

このようにして得られた乾燥菌体から熱クロロホルムで共重合体を抽出し、この抽出液にヘキサンを加えて共重合体を沈澱させ、この沈澱を濾取、乾燥して共重合体を得た。

共重合体の特性：

このようにして得られた共重合体の組成、固有粘度をつぎのようにして測定した。すなわち、

組成： ^1H NMRスペクトルによる。

固有粘度 $[\eta]$ ：30℃、クロロホルム中。

測定結果などを第1表に示す。

尚、実施例4の500MHz ^1H -NMRスペクトル及び125MHz、 ^{13}C -NMRスペクトルを図1及び図2に各々示した。

	炭素源(g)		乾燥菌体重量 (g)	共重合体含有率 (%)	共重合体組成(モル%)		$[\eta]$ (dl/g)
	4-ヒドロキシ酪酸	酪酸			3HB	4HB	
実施例 1	4	0	2.8	7	75	25	—
// 2	8	0	3.3	14	74	26	—
// 3	12	0	4.1	18	74	26	—
// 4	16	0	3.5	19	73	27	4.3
// 5	20	0	2.9	19	69	31	—
// 6	24	0	3.5	13	66	34	4.0

	炭素源(g)		乾燥菌体重量 (g)	共重合体含有率 (%)	共重合体組成(モル%)		〔η〕 (dl/g)
	4-ヒドロキシ酪酸	酪酸			3HB	4HB	
// 7	28	0	3.5	8	64	36	—
比較例 1	0	20	9.6	51	100	0	3.3
実施例 8	4	15	8.5	53	95	5	—
// 9	8	10	7.6	48	87	13	3.9

実施例10

後段培養における炭素源として4-クロル酪酸を1ℓ 10 C H
当り18g使用したこと以外は実施例1と同様の操作により得た共重合体の結果を、表2に示す。

表2のうち連鎖分布、融解温度および融解熱は次の様にして測定した。

連鎖分布；本発明者およびその他の方法(Y. Doi et al, Macromolecules, 19, 2860~2864 (1986))に従いカルボニル炭素の多重線共鳴構造から推定。

融解温度；DSC測定による(昇温速度 10°C/min)

融解熱；DSC測定による

尚、元素分析におけるC₄H₆O₂の計算値は下記のとうり*20

表

2

	乾燥菌体重量 (g)	共重合体含有率 (%)	共重合体組成(モル%)		連鎖分布(モル%)				〔η〕 (dl/g)	融解温度 (°C)	融解熱 (cal/g)	元素分布		
			3HB	4HB	[3HB-3HB]	[3HB-4HB]	[4HB-3HB]	[4HB-4HB]				C	H	Cl
実施例10	5.1	27	89	11	82	9	9	0	3.9	156	11.1	55.50	7.09	0.29
// 11	3.7	30	67	33	55	13	13	19	2.9	166	3.7	55.60	6.64	—
// 12	4.5	20	51	49	32	21	19	28	6.1	159	0.5	55.18	6.95	—
比較例 1	9.5	51	100	—	100	0	0	0	3.3	177	19.5	55.88	7.34	—

〔発明の効果〕

本発明によれば3HB成分と4HB成分を含有する新規のポリエステル共重合体を容易に得ることができる。

さらに、本発明で得られた共重合体は、優れた種々の特性を有しているので、手術糸および骨折固定用材などの医用材料の原料として極めて好適であり、また、徐放性システムへの利用などの多方面への応用が期待され ※

*である。

55.81% 7.02%

実施例11

後段培養における炭素源として4-ヒドロキシ酪酸ナトリウムを1ℓ当り20g使用したこと以外は実施例10と同様の操作により得た共重合体の結果を表2に示す。

実施例12

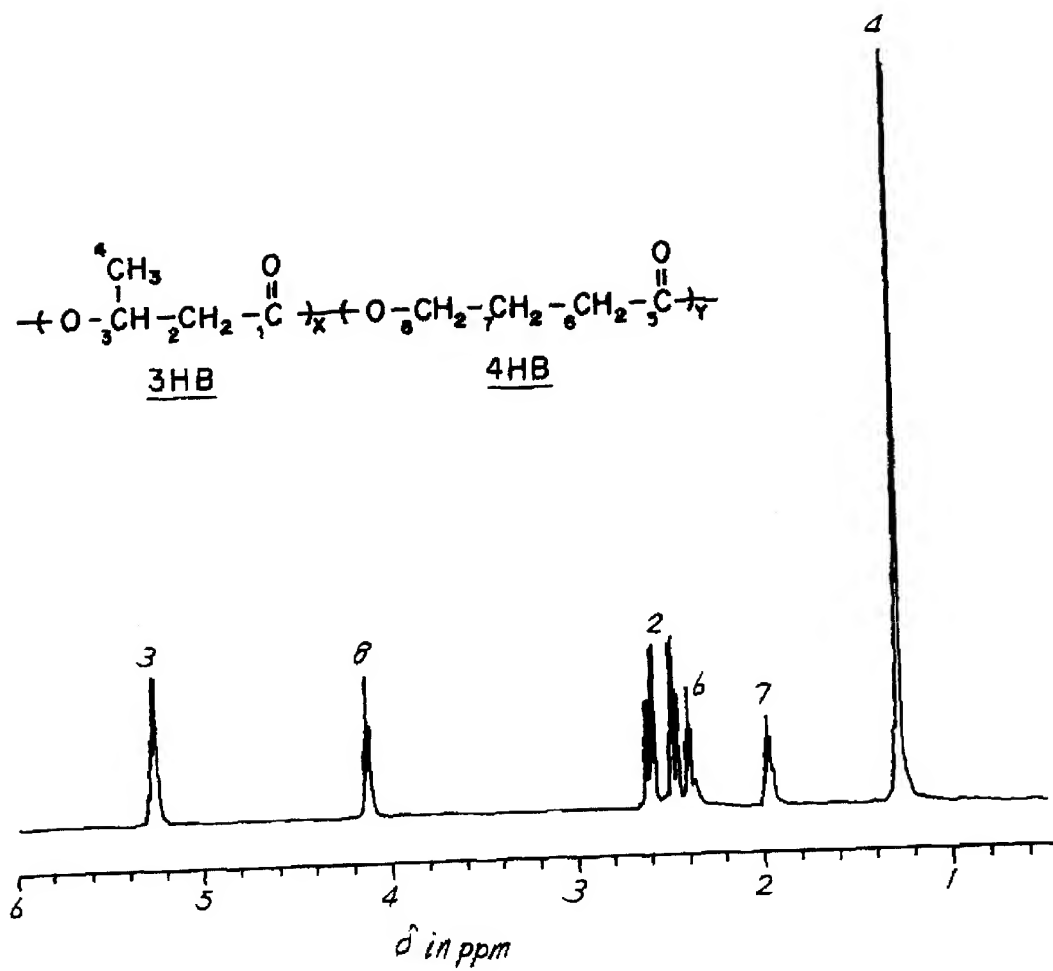
アルカリゲネス ユウトロフスNCIB11599を使用したこと以外は実施例11と同様の操作により得た共重合体の結果を表2に示す。

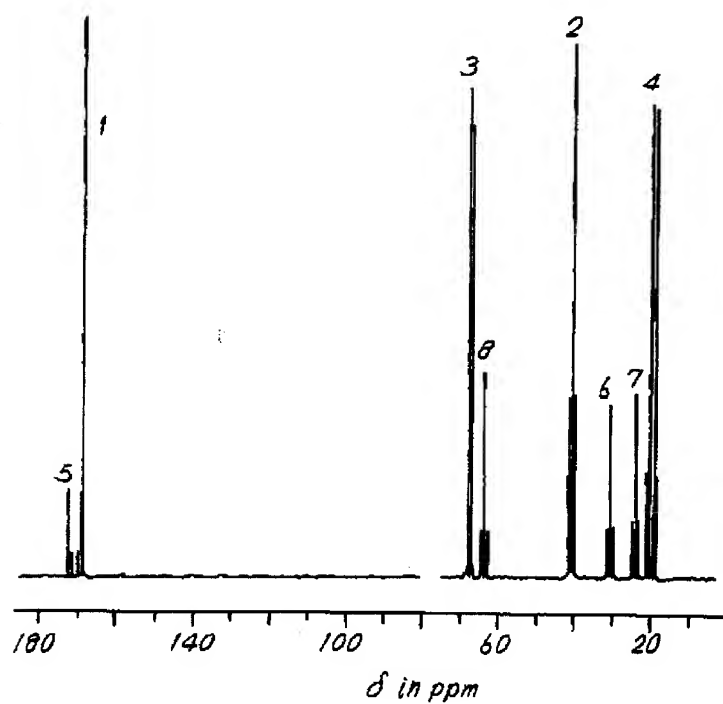
※る。

【図面の簡単な説明】

図1は実施例4で得られた共重合体の500MHz、¹H-NMRスペクトルを、図2は同じく実施例4で得られた共重合体の125MHz、¹³C-NMRスペクトルである。図中の構造式に付した数字は各々ピークの数字に対応するものである。

【第1図】



$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{-(O-CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(=O)-)}_x\text{-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(=O)-)}_y\text{-} \\ \text{3HB} \qquad \qquad \qquad \text{4HB} \end{array}$$


技術表示箇所

C 1 2 R 1:05)